



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11299490 A**

(43) Date of publication of application: 02 . 11 . 99

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C07K 14/415
C12N 1/21
C12Q 1/18
///C12N 1/21 , C12R 1:19)

(21) Application number: **10150493**

(71) Applicant: **KAJI AKIRA**

(22) Date of filing: 23 . 04 . 98

(72) Inventor: **KAJI AKIRA**

(54) PLANT RIBOSOME RECYCLING FACTOR

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new frf gene which consists of a specific gene coding for spinach chloroplast ribosome recycling factor(RRF), and is useful, for example, for the development of next-generation RRF-targeting antibiotics and herbicides.

SOLUTION: This is a new *frr* gene which codes for spinach chloroplast ribosome recycling factor(RRF) having a base sequence shown by the formula, and is useful, for example, for the development of next-generation RRF-targeting antibiotics and herbicides. The *frr* gene is obtained by screening a spinach cDNA library using an antibody against the chloroplast envelope membrane, purifying the obtained positive clones, and cloning by PCR using primers to both ends of the cloning site.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

[illegible]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-299490

(43)公開日 平成11年(1999)11月2日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 0 7 K 14/415

C 0 7 K 14/415

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

C 1 2 Q 1/18

C 1 2 Q 1/18

// (C 1 2 N 1/21

審査請求 未請求 請求項の数9 書面 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平10-150493

(22)出願日

平成10年(1998)4月23日

(71)出願人 591188479

梶 昭

東京都東久留米市大門町1丁目1番9号

(72)発明者 梶 昭

東京都東久留米市大門町1丁目1番9号

(74)代理人 弁理士 葛和 清司 (外1名)

(54)【発明の名称】 植物のリボソームリサイクリング因子

(57)【要約】

【課題】RRFをターゲットとした次世代抗菌剤、除草剤の開発に資する。

【解決手段】ホウレン草のクロロプラストのRRF、これをコードするf r r遺伝子及びこれらを除草剤の製造に用いる方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ホウレン草のクロロプラストのRRFをコードするfrr遺伝子。

【請求項2】 配列表1に示される塩基配列を有するホウレン草frr遺伝子。

【請求項3】 配列表1に示される塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された、請求項2に記載のホウレン草frr遺伝子。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載されたfrr遺伝子によりコードされるホウレン草RRF様蛋白。

【請求項5】 配列表1に示されるアミノ酸配列を有するホウレン草RRF様蛋白。

【請求項6】 配列表1に示されるアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された、請求項5に記載のホウレン草RRF様蛋白。

【請求項7】 ホウレン草frr遺伝子を組み込んだプラスミド。

【請求項8】 請求項7に記載のプラスミドを有する大腸菌。

【請求項9】 植物のRRFを除草剤の製造に用いる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】 本発明は、真核生物のリボソームリサイクリング因子(Ribosome recycling factor, 以下RRF)、及び該RRFをコードする遺伝子(以下frr)に関する。より具体的にはホウレン草のクロロプラストのRRF及び該RRFをコードする遺伝子に関する。さらに本発明は、そのRRFをターゲットとした次世代抗菌剤、除草剤を開発する技術に関する。

【0002】

【従来技術】 蛋白質合成は、すべての細胞の生命活動において必要不可欠な機能であり、「開始」、「伸展」、「終結」及び「リボソームリサイクリング」の四段階から成り立っている。蛋白質合成における最終的なステップ(第4ステップ)は、次の「開始」段階へリボソームを再利用する為に、メッセンジャーRNA、転移RNA、リボソームからなる終結複合体を各々遊離、解離させることにより終了する。原核生物である大腸菌においては、このリボソームの「再利用」はRRFとエロンゲーション因子G(elongation factor G, 以下EFG)により触媒されることが分かっている。このリボソーム「再利用」の過程はJanosi博士らによる総説(1996 Adv. Biophys. 32:121-201)において紹介されている。一方、近年、従来の抗生物質への耐性獲得菌株が数多く報告されてきており、細菌の発育を直接的に制限し得る部位を標的とする、新たな抗生物質の開発が早急に必要とされているので、RRFが抗菌剤のターゲットとして

近年脚光を浴びつつある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 ところでこれまでに得られてきた蛋白質翻訳終結複合体の解離に関する結果はすべて、原核生物での研究が中心となっている。真核生物における重要な報告はいまだなされていない。真核生物においてRRFに相当する遺伝子の報告が成されていない理由の一つとして、この蛋白合成における最終段階の仕組みが原核生物のそれと異なることが挙げられる。すなわち真核生物におけるRRF様の機能蛋白はミトコンドリアやクロロプラストに限られている。もっとも、ミトコンドリアやクロロプラストは遺伝学的に細菌から起源していることがわかっているので、これらのRRFが特に細菌に重要であることが考えられる。

【0004】 この結論を支持する一つの事実として、海底火山菌のM. jannaschiiはその蛋白質合成に関する因子のホモロジーが真核生物のそれぞれの因子と非常に高いことが知られているが(Bullら 1996, Science, 273:1058-1073)、RRF相当の蛋白は見られない。この細菌は蛋白合成系が真核生物と非常に似通っているにも拘らず、ミトコンドリアやクロロプラストにあたるオルガネルが存在しない。このことは、真核生物において蛋白質翻訳終結複合体の解離はRRFではない他の因子により触媒される可能性を示唆している。

【0005】 第二に、真核生物のmRNAはモノシストロニックで原核生物のそれはポリシストロニックである(Kozak 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3438-3445; Dasら1984, Nucleic Acids Res. 12:4757-4768; Schonerら1986 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83:8506-8510; Sprengelら 1985 Nucleic Acids Res. 13:893-909)。従って真核生物においてリボソームのmRNAよりの解離が阻害されても下流のシストロンに影響することはない。然るに原核生物ではこのステップの阻害は原核生物のmRNAがポリシストロニックであるために下流のシストロンの翻訳を阻害することになる。

【0006】 このように真核生物における蛋白質合成の最終段階にあたる蛋白質翻訳終結複合体の解離という第4段階が原核生物のものと異なると考えられるので、新しい型の抗生物質の開発を目的として、専ら原核生物を対象として研究が進められている。従って、これまで真核生物の第4ステップについてはRRFの存在も含めて全く分かっていない。しかしながら、以上のことを勘案すると真核生物について、そのRRFの構造および性状を解析することは、種々の抗菌剤の開発に有用であるばかりか、特に植物のRRFは除草剤の開発にも極めて重要な情報となり得ると考えられる。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は上記の現状を踏まえ、RRFに関する研究を進める中で、真核生物である植物のRRFは植物のミトコンドリアやクロロプラストにおける蛋白合成に関与していること、この形質を同定すれば、ヒトには有害ではない抗生物質を開発する上で重要な情報となり得ること、また、その因子の機能を阻害すれば植物は生存し得ないこと、従って植物RRFの特異的な阻害剤は除草剤としての活用の可能性が充分考えられること等に着目し、さらに鋭意研究を進めた結果、ホウレン草のクロロプラストのRRFをコードする遺伝子 *f r r* を発見してそのRRFの一次構造を同定することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】即ち本発明は、新規なホウレン草の *f r r* 遺伝子及び該遺伝子がコードするRRF様蛋白、またホウレン草 *f r r* 遺伝子を組み込んだプラスミド、該プラスミドを有する大腸菌さらには植物のRRFを除草剤の製造に用いる方法に関する。RRFの一次構造の解明は更に二次、三次構造の解明につながり、除草剤をはじめとして、種特異的な阻害剤をラショナルドラッグデザインにより設計することを可能とするものである。従って本発明によって示されたホウレン草のRRFの一次構造、及びその他の情報は産業上極めて重要な意義を有する。

【0009】さらに、前記の考察から分かるように、RRFをターゲットとした抗菌剤を開発する上でもこれらの情報は非常に重要なものといえるが、驚くべきことに、真核生物RRF遺伝子の存在と、それがコードしているRRFの存在によっては、大腸菌における *f r r* 遺伝子変異を補い得る能力は有さず、むしろその阻害作用を示すことが本発明者によるホウレン草 *f r r* 遺伝子を組み込んだプラスミドを有する大腸菌を用いた実験により判明した。このようにして大腸菌のRRFを阻害すると、大腸菌はその生理学的状況に拘らず死んでしまうことが分かり、RRFをターゲットとした抗菌剤は生育抑制のみならず殺菌作用を有することを示した。

【0010】即ち、本発明者は、ホウレン草 *f r r* 遺伝子を組み込んだプラスミドによる大腸菌の温度感受性RRFに対する作用を後記する実験によって確認した（大腸菌の温度感受性RRFについては特願平10-14747号及びPCT/J P 98/00734参照）。このことから、ホウレン草のRRFのどの部分が大腸菌の温度感受性RRFを阻害するかを調べれば、抗菌剤の探索に極めて重要な情報となり得る。この事実はRRFをターゲットとした抗菌剤の作製に極めて重要な知見であるといえる。ホウレン草のRRFに関するこれらの情報は、この大腸菌RRF機能への阻害作用を有するホウレン草RRFの構造が考えられるのは勿論のこと、今後この二次元、三次元構造解析および阻害メカニズムを究明し、RRF阻害による次世代抗生物質及び除草剤開発に、とくにラショナルドラッグデザインにより抗菌剤を開

発する際の一つの指標として、極めて重要な意義を有する。以下、実験例により本発明をより詳細に示す。以下に示す実験例はあくまでその詳細な解説を目的とするものであり、他の方法を制限するものではない。

【0011】

【実験例】【実験例1】

ホウレン草からの *f r r* 遺伝子の同定を行った実験例
本発明におけるホウレン草 *f r r* 遺伝子の同定は当初、ホウレン草のエンベロップに発現している未知の蛋白の遺伝子をクローニングする為に、葉緑体のエンベロップ膜に対する抗体を用いて λ g t 1 1 に入れたホウレン草 cDNA ライブラリ（計 1.5×10^5 ）より検索したことに始まる。検出されたポジティブクローンを精製した後、 λ g t 1 1 クローニングサイトの両末端に対するプライマーを用いてPCRを行った。この際3種の異なるクローンが得られたが、それぞれの5'末端は同じものであった。また、この得られたインサートの長さは約1.1 K b p であった。この得られた配列を用いて作製した α -32 P ラベルプローブを用いて、ホウレン草の葉に含まれる全RNAについてノーザンブロッティングを行ったところ、ほぼ同じ長さのmRNAが検出された（図1のA）。すなわち得られたcDNAはこの遺伝子の全配列を含むものであったと考えられる。この得られたインサートcDNAを制限酵素K p n I / S a c I で切断した後、ベクターpUC18へ導入しシーケンスを行った結果を配列表1に示す。

【0012】この得られたアミノ酸配列を用いて gene bank を検索した結果、大腸菌のRRF遺伝子のアミノ酸配列（Ichikawaら 1989, J. Biol. Chem., 264: 20054-20059）と非常に高い相同性を有していることが分かった。また他にもこの遺伝子のアミノ酸配列が大腸菌RRF遺伝子のアミノ酸配列と非常に高い相同性を有するアミノ酸配列も見つかり、特に *Daucus carota* (GeneBank accession number X72384) の glycine-rich nuclear located protein (NLP) や *Haemophiles influenzae* (Fleischmannら1995, Science, 269: 496-512)、*Mycoplasma genitalium* (Fraserら1995, Science, 270: 397-403)、*Synechocystis* sp. PCC6803 (Cyano base accession number sl10145) の3種の原核生物のRRF遺伝子のアミノ酸配列と比べ良く保存されていた。大腸菌RRF遺伝子のアミノ酸配列と比べこのホウレン草RRF様遺伝子のアミノ酸配列のC末端部（アミノ酸87から271残基）のみを比べると46%の同一性（66%の相同性）となっているがN末端が異なっているため細菌特異的又は植物

特異的な抗RRF剤の創造は充分可能性があると考えられる。従ってこの発見は産業上非常に重要であると考えられる。ホウレン草RRF様遺伝子のアミノ酸配列とニンジン(RR)のRRFのアミノ酸配列は74%の同一性(89%の相同性)を有している。また、酵母真菌のRRFと予想されている遺伝子(Ouzounisら1995, Protein Sci, 4: 2424-2428)のアミノ酸配列は大腸菌RRFのアミノ酸配列と比較して25%の同一性(46%の相同性)を有し、ホウレン草のRRF様遺伝子のアミノ酸配列と比較して21%の同一性(45%の相同性)を有している(配列表2)。

【0013】このホウレン草RRF様遺伝子は、大腸菌のものとは比べると、そのN末端において86アミノ酸残基が長く付け加えられた様になっており、解析の結果この部分の配列はミトコンドリアやクロロプラストへの局在を示すターゲティング配列を示していることが分かった。

【0014】[実験例2]

(特に光合成を行なう組織において)単一のホウレン草RRF様遺伝子の検出を行った実験例

得られたcDNAをもとにしたプローブを用いてホウレン草ゲノムDNAについてサザンブロッティングを行ったところ、単一の遺伝子が検出された(図1のB)。さらにホウレン草のさまざまな組織から得た全RNAを用いてノーザンブロッティングを行った結果、子葉と葉においてはその発育のあいだ恒常的にこの遺伝子を発現していることが分かった(図1のC)。古い葉や子葉における発現は、若い葉における発現と比べると若干少ないことも観察され、hypocotyleと根においては明らかに発現していないことが観察された。これらのことから、このRRF様の遺伝子の発現は特に光合成を行なう組織に制限されていると考えられる。しかし暗所にて育てたホウレン草の葉においても発現が観察されたこと(図1のD)は、この発現が組織特異的ではあるが光の刺激とは無関係に起こるものであることを示している。

【0015】[実験例3]

大腸菌におけるホウレン草RRF様蛋白の過剰発現とその精製及び抗体作製を行った実験例

pET-15bプラスミドを用いてリコンビナントホウレン草RRF様遺伝子産物の過剰発現を大腸菌中にて試みた。IPTGによる発現誘導2時間30分後大腸菌抽出液を調べたところ、可溶性蛋白の20%ほどの割合でリコンビナントホウレン草クロロプラスト局在RRF様蛋白(以下cpRRFHと記述)が発現しているのが観察された。また同時に、上記のものよりやや分子量の小さい蛋白の過剰発現も観察され、この両者の蛋白を含む分画をアフィニティークロマトグラフィーで精製した(図2のA)。この分画に存在するホウレン草RRF様蛋白をCM-Trisacrylクロマトグラフィーに

で分離した(図2のB)。以上の操作により分離精製されたホウレン草RRF様蛋白を用いて兔に免疫し抗体を得た。得られた抗体はアフィニティー精製し、ウエスタンブロッティングと免疫組織化学実験に用いた。

【0016】[実験例4]

ホウレン草RRF様蛋白のクロロプラストへの局在を示した実験例

前述の大腸菌中で過剰発現させたRRF様遺伝子産物に対する抗体を作製し、葉の抽出液を用いてウエスタンブロッティング解析を行った(図3のA及び図3のB)ところ、配列から予想された分子量(30, 300ダルトン)よりやや小さいサイズ(26, 500ダルトン)のバンドが検出された。これは、前述の通りそのアミノ酸配列からN末端部はクロロプラスト局在のターゲティング配列であり、ここを含む前駆体の形で発現され、目的とする器官へ移行した後、その部位は切断分解されてRRFとして活性を持つ形になると予測していたことと合致するものであった。図3のAは、ホウレン草RRF様蛋白の発現をさまざまな細胞成分内で見たものである。ホウレン草の葉の各細胞成分分画抽出液を用いて行ったウエスタンブロッティングの結果、このホウレン草RRF様蛋白はクロロプラストとミトコンドリアにおいて検出され、葉の全抽出液と比較してそのほとんどはクロロプラストに存在していることがわかる(図3のA)。

【0017】[実験例5]

クロロプラスト内でRRF前駆体がRRFにプロセシングされることを示した実験例

図3のAに示す様にホウレン草RRFはクロロプラスト内においてはストローマに多く存在し、エンベロープ膜には少なく、チラコイド分画からは全く検出されなかった。さらにin vitroで生成されたホウレン草RRF様蛋白前駆体と精製エンドウ豆クロロプラストを用いて、クロロプラスト内におけるプロセシングを証明する実験を行った(図3のB)。この実験で生成された前駆体蛋白(分子量35, 000ダルトン)は、上記(図3のA)のウエスタンブロッティングによりクロロプラストやミトコンドリアから検出されたものと同じ分子量(26, 500ダルトン)で検出された。換言すれば、エンドウ豆のクロロプラストはホウレン草のRRF様前駆体をプロセシングすることが証明された。なお、このプロセシングを受けた蛋白はThermolysin処理後も検出されたことから、クロロプラストへ取り込まれクロロプラスト内にてプロセシングを受けたことがわかる。これらの事実により、ホウレン草RRF様前駆体蛋白はクロロプラストへ移行した後、そのクロロプラストターゲット配列であるN末端部の切断プロセシングを受けることが明らかになった。

【0018】[実験例6]

ホウレン草クロロプラストからRRF様蛋白を精製した

実験例

図4に示す実験では、ハウレン草クロロプラストストローマからハウレン草RRF様蛋白の精製を行った。大腸菌内において一過性発現をさせたRRF様蛋白に対する抗体を用いたCM-Trisacrylカラムにより、単一のポリペプチドすなわちハウレン草RRF様蛋白を精製溶出させた。この際、3Kgのハウレン草の葉より0.3mgのRRF様蛋白を精製出来たが、これはストローマ蛋白の2000分の1にあたり、このハウレン草RRF様蛋白がマイナーなクロロプラスト蛋白であることがわかる(図4のA)。この精製ハウレン草RRF様蛋白におけるN末端のアミノ酸配列を調べたところ、ATMEEVEAEKであり、これは前述したcDNAより予想されるアミノ酸配列の79から88残基と合致した。すなわち、一度前駆体蛋白として発現したものがプロセッシングを受けて機能蛋白となるという事実を裏付けるものである。このプロセッシング後のハウレン草RRF様蛋白の分子量は21,838ダルトン(193アミノ酸残基)であり、上記事実より前駆体蛋白の78アミノ酸残基までがクロロプラスト局在部位でプロセッシング後切断される部分と定義できる。

【0019】【実験例7】

ハウレン草RRF様蛋白が大腸菌の中で機能できないことを示した実験例

RRF遺伝子変異大腸菌株を用いて、ハウレン草RRF様蛋白で大腸菌RRFの機能を補えるかを見る実験を行った。方法は以下の通りである。染色体上のfrr(RRFをコードする遺伝子)のフレームシフト変異の為そのままでは発育能を持たない大腸菌株LJ2708は、その発育に野生型frr遺伝子を持つプラスミド(pPEN1054sacBneo)を必要とする。この大腸菌株に、ハウレン草RRF様蛋白をコードする遺伝子のうち成熟型RRF(切断分解後機能を持つと思われる部分)をコードしている遺伝子を導入したプラスミド(pKK233-2RRFM)を導入し、インコンパチビリティの理論を用いてハウレン草のRRFが大腸菌中で機能を発揮するか否かを検討した(表1)。この表に示*

ハウレン草RRF様遺伝子の大腸菌中での機能

導入された プラスミド	導入されたプラス ミドの持つfrr遺 伝子	研究された形質 転換体の数	受容体がもともと下に示したプラス ミドを持っていたときに野生型イン サートを持つColE1レプリコンを保 持していた形質転換体コロニーの%	
			ColE1レプリコン + WT-frr (ストレインLJ2708)	ColE1レプリコン + pSC101レプリコン + WT-frr (ストレインLJ2211)
pKK233-2RRFM	ハウレン草	32	100	9.4
PRR2	大腸菌	16	12.5	0
pUC19	なし	16	100	0

LJ2708とLJ2211の大腸菌株について、pKK233-2RRFM(ハウレン草RRF様遺伝子を含

*されている様に、大腸菌が生存するためにはハウレン草のRRFが存在しても大腸菌のRRFを必要とし、ハウレン草のRRFは大腸菌中で機能しないことが示された。

【0020】【実験例8】

ハウレン草のRRFの大腸菌における発現は大腸菌に対してRRF阻害致死作用を有することを示す実験例

表2において、ハウレン草RRF様蛋白は大腸菌温度感受性RRF遺伝子変異菌株の発育を阻害することを示している。すなわち、大腸菌株にハウレン草RRF様遺伝子を含むプラスミドを導入し発現させた結果、その宿主細胞が温度感受性RRF遺伝子変異株を持つ場合には、宿主細胞が野生型RRF遺伝子を持つ場合に比べて、10の5剰分の1の発育能しか示さなかった。プラスミドの導入を行ない又はハウレン草RRFの発現をさせない条件ではほぼ正常の発育を示した。

【0021】また、このハウレン草RRF様遺伝子を含むプラスミドは野生型RRF遺伝子を持つ大腸菌中では安定であるが、温度感受性RRF遺伝子変異株を持つ大腸菌中では不安定であった(図5)ことから同様のことが分かる。この実験で宿主大腸菌はlacI^q遺伝子を持つ。その為ハウレン草RRF様遺伝子の発現にはIPTGの添加による誘導を必要とするが、このようにその発現の誘導が行われない条件下においても温度感受性RRF遺伝子変異株を含む大腸菌によるハウレン草RRF様遺伝子を含むプラスミドの排除が行われた。このことは微量のハウレン草RRFでも温度感受性の大腸菌のRRFを低温にの温度感受性RRFの働く温度)においても阻害し、菌の生育を防ぐことを示す。また、大腸菌に対するハウレン草RRFの影響を更に詳しく調べる為に図6に示す実験を行った。すなわち、静止期または増殖期の温度感受性RRF遺伝子変異株であるLJ2221においてハウレン草RRF様遺伝子の発現を誘導したところ、いずれの状態でもその生育が阻害され殺菌作用を示した。

【0022】

【表1】

受容体がもともと下に示したプラスミドを持っていたときに野生型インサートを持つColE1レプリコンを保持していた形質転換体コロニーの%

ColE1レプリコン + WT-frr (ストレインLJ2708)	ColE1レプリコン + pSC101レプリコン + WT-frr (ストレインLJ2211)
100	9.4
12.5	0
100	0

むColE1レプリコン、アンピシリン耐性遺伝子を持つ)、pRR2(E.coli frrを含むColE

1レプリコン、アンピシリン耐性遺伝子を含む)、pUC19 (ColE1レプリコン、アンピシリン耐性遺伝子を含む)の三種類のプラスミドを導入し、それぞれ形質転換を行った。形質転換を行った大腸菌はアンピシリ*

*ンを含む培地にて32℃で培養し、それらの新たに導入されたプラスミドの存在を確認した。

【0023】

【表2】

ホウレン草RRF様遺伝子の大腸菌の温度感受性frr遺伝子変異株での

機能

受容株	受容株中のfrr	受容株中のlacI ^r の存在	選択時のIPTG添加	50ngホウレン草RRFクローンあたりの形質転換体の数	ホウレン草RRFクローン形質転換の効率
MC1061	野生型	-	-	1.0×10^4	0.5
LJ14	ts-frr14	-	-	5.4×10^1	3.2×10^{-4}
LJ2848	野生型	+	-	2.0×10^4	1
LJ2221	ts-frr14	+	-	1.7×10^4	1
LJ2848	野生型	+	+	8.4×10^4	0.4
LJ2221	ts-frr14	+	+	6.9×10^1	4.1×10^{-5}

大腸菌株MC1061, LJ14, LJ2848, LJ2221にホウレン草RRF様遺伝子を含むプラスミド (pKK233-2RRFM、アンピシリン耐性遺伝子も含む)を導入し形質転換を行った。形質転換された大腸菌株はアンピシリンで選択し、表中に示した条件下においてその発育したコロニー数よりプラスミド50ngあたりのコロニー数を計算して示した。

【0024】以上のように、ホウレン草RRF様蛋白は野生型RRFに弱い阻害作用を示すが温度感受性の大腸菌RRFには極めて強い阻害作用を示し、これは温度感受性大腸菌RRFが充分機能し得る温度においてみられた。このことは、大腸菌のRRFを特異的に又非可逆的に阻害すると大腸菌の静止期、成長期に関係なく阻害作用を有すること、即ち、細菌のRRFの阻害剤の中には

静止期においても殺菌作用を有するものが存在し得ることを示唆している。従って、上記の実験結果は、本発明により同定されたホウレン草のアミノ酸配列から出発して、細菌のRRF阻害剤のlead compoundsが得られる可能性を強く示すものであって、従来にない新規な抗菌剤の開発にとって極めて重要な意義を有するものである。

【0025】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1109 (核酸)、271 (アミノ酸)

配列の型: 核酸及びアミノ酸

配列

CTGTCTCATCACCAATCTCAGCTCTAATGGCGGCATCGTCACCTTTCCTCTGCAACTTCTT	(60)
M A A S S L S S A T S	11
ATCTTCACTCTTTTAGGCGTTCGCAACTCTGCGTCTCTCTTCAAGGTGTTAGCGATATGG	(120)
Y L H S F R R R N S C V S L Q G V S D M	31
AATGTAATATTGCGCGAACCAACGTTTCAGTCTGGAGGTCTTCTGCTAACTATGTTAGGA	(180)
B C N I A R T N V S V W R S S A N Y V R	51
TGGATTGTGGTGTAAAGAGTTTTCTGGGAAGGCTGTCTTCTGAAACACTTGCABAACC	(240)
N D C G V K K P S G K A V V V K Q L Q N	71
GAGCAGGAACCTTTTAGGTGTGCAACTATGGAGGAAGTGAAGCTGAAAAGTCTGTTGATAG	(300)
R A G T F R C A T M E E V E A E K S L I	91
AGACGAACACAAAACAAAGGATGGAGAGACTATTGAAACAATACGCTCAAAATTTCAATT	(360)
E T N T K Q R M E K T I E T I R S N F N	111
CAGTAAGGACAAATCGAGCTAGTCCAACAATGTTGGATCGGATAGAGGTTGAGTACTATG	(420)
S V R T N R A S P T M L D R I E V E Y Y	131
GAATCCTGTCAAGCTTGAAGAAGCATTGCTCAAATTAGTACCCAGATGCTAGTTCCTTTT	(480)
G T F V S L K S I A Q I S T P D A S S L	151
TGATATCACCATATGACAAATCAAGCTTGAAGGCCATAGAGAAGGCAATAGTTACCTCTC	(540)
L I S P Y D K S S L K A I E K A I V T S	171
AACTTGGTGTTAGTCCAAATAATGACGGTGAAGTTATCCGGCTGTCCCTCCCTCCATTAA	(600)
Q L G V S P N N D G E V I R L S L P P L	191
CTTCAGATAGAAGGAAGGAGCTTGCAGAAAGTTGTTTCTAAACTTGCAGAAGAAGGAAGG	(660)
T S D R R K E L A K V V S K L A E E G K	211
TTGCAGTGAGGAACATAAGAAGAGATGCTCTGAAATCTTATGAAAACTTGAGAAGGAAA	(720)
V A V R N I R R D A L K S Y E K L E K E	231
AAAAGCTTTTCGGAAGATAATGTGAAAGACCTATCGGCTGATCTGCAGAAGTTGACCGATG	(780)
K E L S E D N V K D L S A D L Q K L T D	251
AGTACATGAAGAAGGTTGAGTCTATCTACAAGCAGAAAGAACAGGAGTTAATGAAAGTCT	(840)
E Y M K X V E S I Y K Q K E Q E L M K V	271
AAAGCCAGTAGAATGACATAAACTTGCCAACTTCCCAAACCTGCAATTCCGATGTCCCTT	(900)
AATGGTAAACATGATGCCTGGTCTTTTGTGTCAGTTTCTCTTGTGAATAACACTACAG	(960)
ATCCCCGGAAATAGGCTTTTGATTATCAAAACTCGGTAGAATTGATTACGCACCAAGTAA	(1020)
TTTTGCCTACTTTATTGTAAATGGATTCTCGGAAGATGGTAACCACITTAATAGTCAA	(1080)
TGTTCAATTCATAAAAAAAAAAAAAAAAAA	(1109)

【0026】配列表1

ハウレン草RRF様遺伝子のcDNAとアミノ酸配列
終始コドンは*で示してある。下線は、後述するハウレン草クロプラストより精製し解析した天然のハウレン草RRF様蛋白のN末端10アミノ酸残基の位置を示してある。太字は、これらより予想される成熟ハウレン草

RRF様蛋白に相当する部分を示す。

【0027】配列番号：2

配列の型：アミノ酸

配列の特徴

特徴を決定した方法：S

配列

13

14

cpRRFH	EKSLIETNT.	KQRMETIET	IRSNFNSVRT	NRASPTMLDR	IEVEYYGTFV	135
NLRRFH	EKSLIEKSV.	KERMEKTIEN	VKASFNSIRT	7RSNPDMLDK	IKVEYYGTPT	93
EcoRRF	MISDIRKDA.	EVRMDKVEA	FKTQISKIRT	GRASPSLLDG	IVVEYYGTPT	49
HinRRF	MLNQIKKDA.	QDRMEKSLEA	LKGHISKIRT	GRACPSLLDA	IQVEYYGAAT	49
SynRRF	MKLAEI...	KDHMQKSVEA	TQSFNTIRT	GRANASLLDR	ITVEYYGAET	46
MgeRRF	MTKAHYIDFF	KQAADKKIQW	LKSELTKIRT	GRPNPKIFDN	LLIESYQKEM	50
ScRRFH	IDVNELLKKA	ETQFKRTLEI	QKQKMNEIKQ	GNFNPKVFN	LVFKQNRKFT	95
Consensus		*M*K *E	* * * *RT	R* P *LD	I VHYTG*	50

cpRRFH	SLKSIAQIST	PDASSLLISP	YD.KSSLKAI	EKAIVTSQLG	VSPMNDGEVI	184
NLRRFH	SIRSIAQLST	PDSSSLVNP	YD.KSSLKDI	EKAIVNSDLG	ITPMNDGDVI	142
EcoRRF	PLRQLASVT	EDSRTIKINV	FD.RSMSPAV	EKAIMASDLG	LNPNSAGSDI	98
HinRRF	PLRQLANVA	EDARTLAVTV	FD.RSLISAV	EKAILTSDLG	LNPSSAGTTI	98
SynRRF	PLKSLATIGT	PDASTIVIQP	PD.MSGIGTI	EKAISLSDLG	LTPMNDGKVI	95
MgeRRF	PLISLAQVTI	NPPREIIKIP	FDPKSNNTAI	YSEIQANIG	VQPVIDGEKI	100
ScRRFH	DIATTSKGGK	NALLITVFDP	KDVKTVISGV	LAANLNLTP	RVPNNDLQL.	144
Consensus	*L* *A **	D* ** *	*D *S **	EKAI S LG	* P G I	100

cpRRFH	RLSLPPLTSD	RRKELAKVVS	KLAEEGKVAV	RNIRRDALKS	YEKLEKEKKL	234
NLRRFH	RLSIPOLTAD	RRKELSKIYA	KQAEEGKVAL	RNIRRDALKS	YDKLEKEKKL	192
EcoRRF	RVPLPPLTEE	RRDLTKIVR	GEAEQARVAV	RNVRRDANDK	VKALLKDKKI	148
HinRRF	RVPLPPLTEE	RRDLTKIVK	GEGEQGVAV	RNVRRDANDK	IKALLKDKKI	148
SynRRF	RLNIPPLTAE	RRKELVKVAG	KLAEEGKVAI	RNIRRDADVE	VRKQEKNSDI	145
MgeRRF	RVNFPQITQE	TRLENIKHVK	KIIEQIYQEL	RVVRRDA...	LQMIKKDNH.	146
ScRRFH	KVSLPPTTE	SRLKVAKDLK	RVFEYKQSS	LKDSLGTIRG	SILKEFKSPK	194
Consensus	R* *P LT *	RR**L K*V	*E **VA*	RN*RRDA	* K* *	150

cpRRFH	SEDNVKOLSA	DLQKLTDEYM	KKVESIYKQK	BQELMKV		271
NLRRFH	SEDNVKOLSS	DLQKVIDEYI	KKVDSIFKQK	EKELMTV		229
EcoRRF	SEDDRRSQD	DVQKLTDAAI	KXIEAALADK	EASLMQF		185
HinRRF	SENEQHKAE	EIQKITDIYI	KKVDEVLDK	EKELMDF		185
SynRRF	SEDEARDLQE	EIQKLTQST	KRIDELLAAR	EKDITTV		182
MgeRRF	NEDLENSLKA	EIEKINKNYS	NQLEEIQKDK	EKELTTI		183
ScRRFH	KDDAVRKAER	DLEKLHKDYV	NKLHDQFQKV	EKSTVK		230
Consensus	SED *	**QK* D	K*** *	K E EL*		187

【0028】配列表2

予想されるホウレン草RRF様アミノ酸配列と他種RRFを含むアミノ酸配列との比較を示す。

NLRRFH: *Daucus carota* の核蛋白D2 (genebank accession number X72384)

EcoRRF: 大腸菌RRF (J. Biol. Chem., 264, 20054-20059, 1989)

HinRRF: *Haemophilus influenzae* RRF (Science, 1995, 269, 496-512)

SynRRF: *Synechocystis* sp. P

CC6803 (Cyanobase accession number s110145)

MgeRRF: *Mycoplasma genitalium* RRF (Science, 1995, 270, 397-403)

ScRRFH: 酵母様真菌ミトコンドリアRRF (Protein Sci., 1995, 4, 2424-2428)

【0029】配列番号: 3

配列の型: 核酸及びアミノ酸配列

Cons		W * * A N Y V *	29
S	E C N I A R T N V S V W R S S A N Y V R		51
So	AATGTAATATTGGCGGAACCAACGTTTCAGTCTGGAGGTCTTCTGCTAACTATGTTAGGA		180
Dc	CTTGGAAGTGCCTGCCAATTATGTCAA		30
Dc#	W T A A A N Y V K		9
Cons	* G K F * K * V V * Q		29
So	M D C G V K K P S G K A V V V X Q L Q N		71
So	TGGATTGTGGTGTAAAGAAGTTTTCTGGGAAGGCTGTTGTTGTGAAACAGTTGCAAAACC		240
Dc	TTAAAGTGGCCACCGGAAATTTGCCCGCAAAACTGTTGTTTGTCTACAA----AAGA--		84
Dc#	I K V G T G K F A R K T V V L S Q - K -		27
Cons	R * G T * C A T M E E * E A E K S L I		49
So	R A G T F R C A T M E E V E A E K S L I		91
So	GAGCAGGAACITTTTAGGTGTGCAACTATCGAGGAAGCTCGAAGCTGAAAAGTCGTTGATAG		300
Dc	GAACGGGAACCCCTGAAGTGTGCGACTATGGAAGAGATTGAAGCTGAAAAATCTTTGATTG		144
Dc#	R T G T L K C A T M E E I E A E K S L I		47
Dc		*	
Cons	E K R M E K T I E * * * F N		69
So	E T N T K Q R M E K T I E T I R S N F N		111
So	AGACGAACACAAAAACAAGGATCGAGAAGACTATTGAAACAATACGCTCAAATTTCAATT		360
Dc	AGAAAAGTGTAAAGAAAGAATCGAAAAGACTATTGAAAATGTCAAGACCAAGTTTCAACT		204
Dc#	E K S V K E R M E K T I E N V K A S F N		67
Dc		M S K Q V S T	7
Cons	S * R T - ? R * P M L D * I V E Y Y		89
So	S V R T - N R A S P T M L D R I E V E Y Y		131
So	CAGTAAGGACA-AATCGAGCTAGTCCAACRATGTTGGATCGGATAGAGGTTGAGTACTATC		420
Dc	CCATTAGGACCGGAACGTTCAAATCCAGATATGCTTGATAAGATCAAGGTAGAGTACTACI		264
Dc#	S I R T ? R S N P D M L D K I K V E Y Y		87
Dc	P L G R E R S N P D M L D K I K V E Y Y		27
Cons	G T P S L * S I A Q * S T P D * S S L		109
So	G T P V S L K S I A Q I S T P D A S S L		151
So	GAACCTCTGTGACGTTGAAAAGCATTTGCTCAAATTAGTACCCAGATGCTAGTTCCCTTT		480
Dc	GAACCTCTACTAGCTTAAAGAGCATAGCTCAAATCAGTACTCTGATTCGAGTTCTCTCC		324
Dc	G T P T S L R S I A Q O L S T C T P D S S S L		107

【0 0 3 0】配列表 3

ホウレン草RRF様遺伝子と*Daucus carota*のglycine-nuclear located proteinとの遺伝子配列とアミノ酸配列の比較を示す。

S o : ホウレン草 R R F 様遺伝子

Dc: *Daucus carota* ♂ Hlycine-nuclear located protein

【図面の簡単な説明】

【図1】ホウレン草RRF様遺伝子のノーザンブロッティングとサザンブロッティングによる解析を示した図。

A: ノーザンブロッティングにより、ホウレン草 RRF 様遺伝子の mRNA が約 1.1 kb であることを示した図である。葉緑体のエンベロープ膜の葉緑体に対する抗体を用いて λ gt11 に入れたホウレン草 cDNA ライブラリより検出したポジティブクローンをプローブとし

て用いた。

B: サザンブロッティングにより、ホウレン草様RRF遺伝子がゲノムDNA上にあることを制限酵素EcoRI (レーン1) とEcoRV (レーン2)、HindIII (レーン3) を用いて示した図である。

40 C: ノーザンプロットングにより、発芽20日後のホウレン草の子葉(C)、葉(L)、hypocotyls(H)、根(R)において、特に光合成組織特異的に発現することを示した図である。L1とL3は夫々古い葉と若い葉を用いた。

D:ノーザンブロッティングにより、ホウレン草RRF様mRNA発現が、光の刺激により影響を受けないことを示した図である。発育条件は以下の通りである。

レーン1：暗所にて18日間（D）、

レーン2: 暗所にて14日間の後明所にて4日間 (D+I.)

レーン3: 明所にて18日間(L)と示した。

上記は全て、ハウレン草RRF様遺伝子のヌクレオチド269から477を α -32Pでラベルしてプローブとした。

【図2】大腸菌株B834(DE3)pLysSにおいて発現ベクターpET-15bを用いて、リコンビナントハウレン草RRF様蛋白を過剰発現させ解析した図。

A: 大腸菌全抽出液と過剰発現されたハウレン草RRF様蛋白をSDS-PAGEにて解析した。

レーン1: IPTGによる発現誘導前の大腸菌全抽出液、

レーン2: IPTGによる発現誘導2時間30分後の大腸菌全抽出液、

レーン3, 4: IPTGで誘導を行った大腸菌全細胞抽出液からニッケルアフィニティークロマトグラフィーにて精製したもの(レーン4)とそのフロースルー(レーン3)、

レーン5: 分子量マーカー

B: CM-Trisacrylクロマトグラフィーにてハウレン草RRF様蛋白を精製しSDS-PAGEにて解析した図である。

レーン1から4: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを含む分画、

レーン5から8: ハウレン草RRF様蛋白を含む分画。

【図3】A1及びA2: ハウレン草RRF様蛋白の細胞内局在を観測した図。

ハウレン草の葉の抽出液を成分分画してSDS-PAGEを行い、精製抗リコンビナントハウレン草RRF様蛋白抗体によるウエスタンブロッティング(A1)とクーマシーブリリアントブルー染色(A2)を行った。

レーン1: 葉の全抽出液(LE)、

レーン2: ミトコンドリア(Mito)、

レーン3: クロロプラスト(Chl)、

レーン4: エンベロープ(E)、

レーン5: ストローマ(S)、

レーン6: チラコイド(T)、

レーン7: 分子量マーカー

B: 精製エンドウ豆クロロプラスト内でのN末端領域を含むハウレン草RRF様蛋白の修飾をウエスタンブロッティングにより観測した図。

レーン1: 標識蛋白、

レーン2: 標識蛋白導入後のクロロプラスト抽出液、

レーン3: 標識蛋白導入後のクロロプラストを、クロロプラスト表面(細胞膜側)に存在している標識蛋白を除く為にthermolysinで処理したもの。

【図4】ハウレン草クロロプラストより天然のハウレン草クロロプラストRRF様蛋白を精製し、ウエスタンブロットにより解析した図。

A: ハウレン草ストローマ抽出液のCM-Trisacrylクロマトグラフィーによる分画を示す図である。

B: 全ての分画をSDS-PAGEによる解析図。

レーン1: ストローマ抽出液(S)

レーン2から8: それぞれCM-Trisacrylクロマトグラフィー精製における溶出分画35, 37, 39, 41, 43, 45

レーン9: 大腸菌中において一過性発現させて精製したヒスチデントグーハウレン草RRF様蛋白(C)(B)のSDS-PAGEについて、抗ハウレン草RRF様蛋白ポリクローナル抗体を用いて行ったウエスタンブロッティングによる解析図。

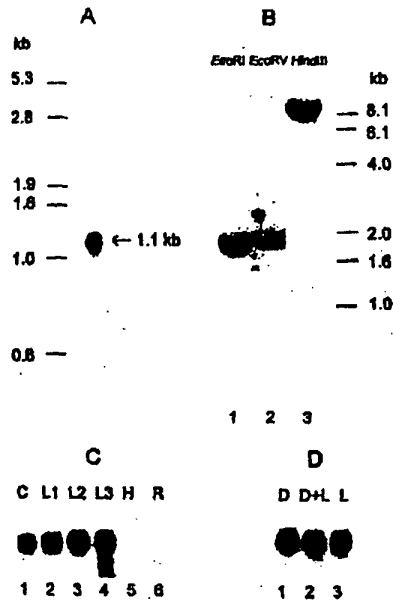
【図5】ハウレン草RRF様遺伝子を持つプラスミドが、大腸菌温度感受性RRF遺伝子変異株中において不安定であることを示すグラフ。温度感受性RRF遺伝子変異(ts-frf)を持つ大腸菌LJ2221(左)と野生型RRF遺伝子(wt-frf)を持つ大腸菌LJ2846(共にlacIq遺伝子を持つ)をハウレン草RRF様遺伝子を含むプラスミドpKK233-2RRFM(上段)もしくはそのベクターpKK233-2(下段)で形質転換させアンピシリンを含むLB液体培地にて0.05ABS(OD 540nm)に合わせた後、それぞれ表記の時間32℃(温度感受性RRFが機能できる温度)で培養した。その後、それぞれアンピシリンを含むLAアガー(●)もしくは含まないLAアガー(○)上にて32℃で一夜培養してそのColony forming unitを求めた。縦軸はCfu/ml、横軸はTime(hours)を示す。

【図6】A: ハウレン草RRF様遺伝子の発現が、温度感受性RRF遺伝子変異株であるLJ2221の静止期にある細胞へ与える影響を示すグラフ。大腸菌温度感受性RRF遺伝子変異株LJ2221(ts-frf)(左)もしくは野生型RRF遺伝子を持つ大腸菌株LJ2846(wt-frf)(共にlacIq遺伝子を持つ)にハウレン草RRF様遺伝子を含むプラスミドpKK233-2RRFM(○●)もしくはそのベクターpKK233-2(□▲黒四角▼)を導入した。それぞれアンピシリンを含むLB液体培地において0.05ABS(OD 540nm)に希釈し、5mMのIPTG存在下(●▲黒四角▼)もしくは非存在下(○□)で表記の時間培養した。その後各培養液よりアンピシリンを含むLAアガー上にて一夜培養してそのcolony forming unitを求めた。縦軸はCfu/ml、横軸はTime(hours)を示す。

B: ハウレン草RRF様遺伝子の発現が温度感受性RRF遺伝子変異株LJ2221の増殖期にある細胞へ与える影響を示すグラフ。ハウレン草RRF様遺伝子を含むプラスミドpKK233-2RRFMを導入した大腸菌温度感受性RRF遺伝子変異株LJ2221(lacI^q遺伝子を持つ)をLB液体培地中にて0.00005ABS(OD 540nm)に希釈した後、4時間(左)、6時間(中央)、8時間(右)にて培養した。

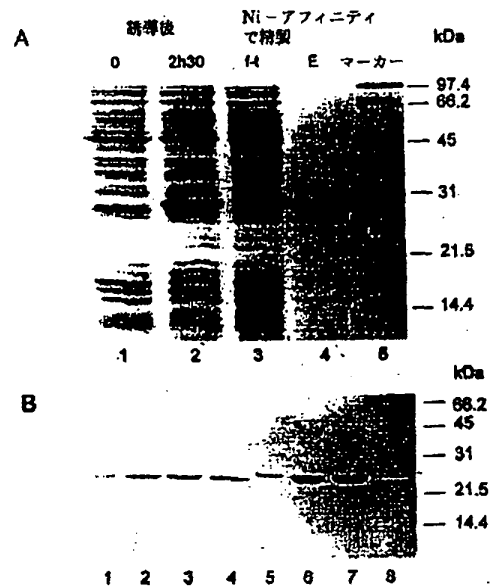
その後それぞれの培養液を二分して5mMのIPTG存在下()もしくは非存在下(○)で表記の時間培養し、(A)と同様にしてcolony forming

【図1】

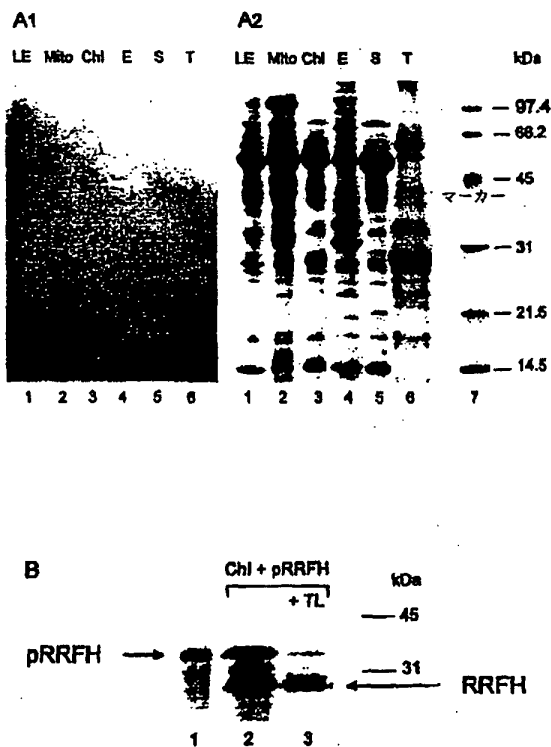


unitを求めた。縦軸はCfu/ml) 横軸はTime (hours)を示す。なお、培養温度はすべて32℃で行われた。

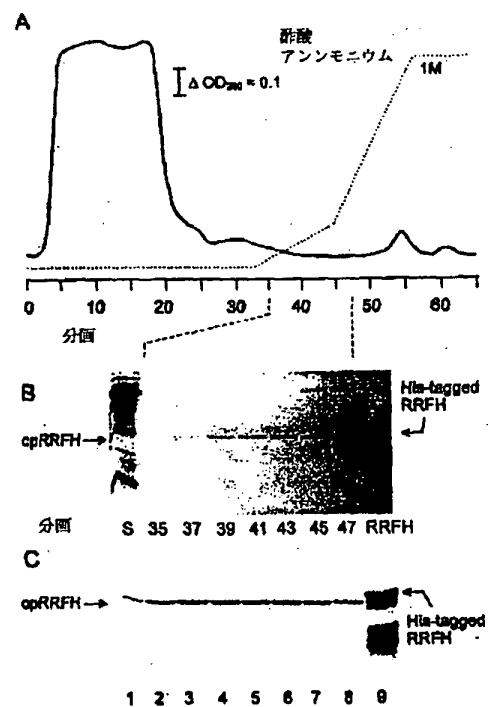
【図2】



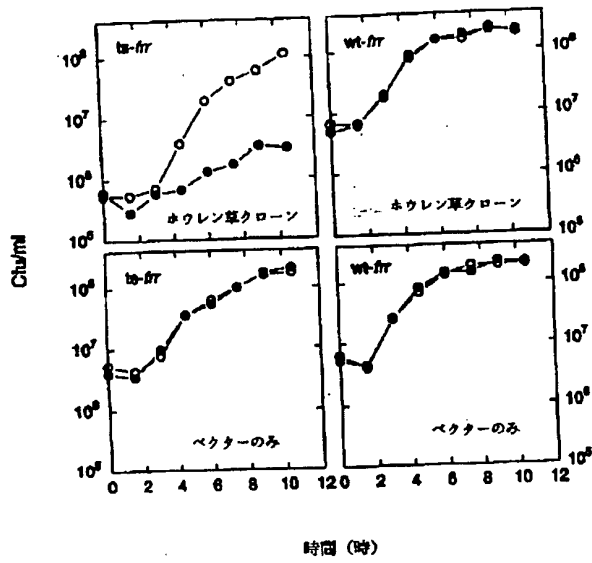
【図3】



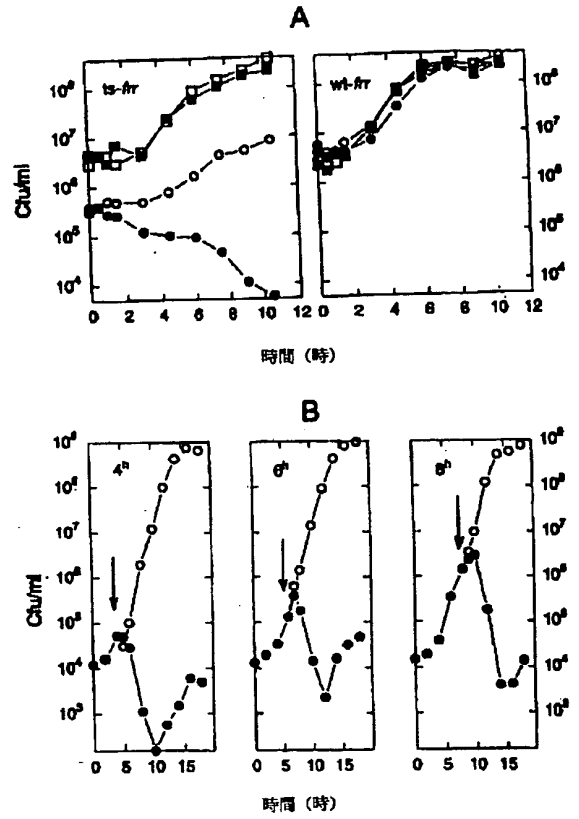
【図4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

F I

C 1 2 R 1:19)